

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07H 1/08, C12Q 1/68, B01F 11/00, 13/04 // C12N 15/10, C07H 21/00 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/28171 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. August 1997 (07.08.97) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01291 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. Juli 1996 (16.07.96) (30) Prioritätsdaten: 296 01 618.7 31. Januar 1996 (31.01.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INVITEK GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HILLEBRAND, Timo [DE/DE]; Bansiner Strasse 60, D-12619 Berlin (DE). BENDZKO, Peter [DE/DE]; Ifflandstrasse 32, D-12623 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |
| (54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE SIMULTANEOUS ISOLATION OF GENOMIC DNA AND HIGH-PURITY TOTAL RNA (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SIMULTANEN ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNS UND HOCHREINER TOTAL RNS (57) Abstract <p>The invention concerns a method and device for the rapid, simultaneous isolation of genomic desoxyribonucleic acid (DNA) and cellular total ribonucleic acid (RNA), free of genomic DNA from various starting materials. The fields of application are molecular biology, biochemistry, gene technology (in particular gene therapy), medicine, biomedical diagnosis, veterinary medicine, food analysis and all related fields. The method proposed is characterized in that materials containing DNA and RNA are lysed in a special buffer, the lysate incubated with a mineral carrier, the carrier with the DNA bound to it separated off and washed with buffer solution, and the DNA subsequently separated from the carrier with a buffer of lower salt concentration. The lysate left after separating off the DNA bound to the carrier is mixed with phenol, chloroform and sodium acetate in defined proportions, the phases allowed to separate, and the total RNA precipitated from the aqueous phase by adding isopropanol. Lysis is carried out using buffers containing chaotropic salts with a high ionic strength. Lysis of the material and bonding of the genomic DNA to the carrier are both carried out in the same buffer. Both the lysis of the starting material and all necessary washing steps are carried out in an apparatus which makes it possible to process 12 samples in parallel.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur schnellen simultanen Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS) und zellulärer Total Ribonukleinsäure (RNS), frei von genomischer DNS, aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien. Anwendungsgebiete sind die Molekularbiologie, die Biochemie, die Gentechnik, insbesondere die Gentherapie, die Medizin, die biomedizinische Diagnostik, die Veterinärmedizin, die Lebensmittelanalytik und alle angrenzenden Gebiete. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß DNS und RNS enthaltende Materialien mit einem speziellen Puffer lysiert, das Lysat zur Isolierung der genomischen DNS mit einem mineralischen Trägermaterial inkubiert, der Träger mit der gebundenen DNS abgetrennt und mit Pufferlösung gewaschen und nachfolgend die DNS mit einem Puffer geringer Salzkonzentration vom Träger abgelöst wird. Das nach Abtrennung der trägerfixierten DNS erhaltene Lysat wird mit definierten Anteilen von Phenol, Chloroform und Natriumacetat versetzt und die Total RNS nach Phasentrennung aus der wäßrigen Phase unter Zugabe von Isopropanol präzipitiert. Die Lyse wird mit Puffern, die chaotrope Salze hoher Ionenstärke enthalten, durchgeführt. Die Lyse des Materials und die Bindung der genomischen DNS an den Träger werden jeweils durch den selben Puffer vermittelt. Sowohl die Lyse des Ausgangsmaterials wie auch alle notwendigen Waschschritte erfolgen in einer Vorrichtung, welche damit die parallele Bearbeitung von 12 Proben realisiert.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien | GB | Vereinigtes Königreich | MX | Mexiko |
| AT | Österreich | GE | Georgien | NE | Niger |
| AU | Australien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BB | Barbados | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BF | Burkina Faso | IE | Irland | PL | Polen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BJ | Benin | JP | Japan | RO | Rumänien |
| BR | Brasilien | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| BY | Belarus | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CA | Kanada | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SG | Singapur |
| CG | Kongo | KZ | Kasachstan | SI | Slowenien |
| CH | Schweiz | LJ | Liechtenstein | SK | Slowakei |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LR | Liberia | SZ | Swasiland |
| CN | China | LK | Litauen | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| EE | Estland | MG | Madagaskar | UG | Uganda |
| ES | Spanien | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | MN | Mongolei | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MR | Mauretanien | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | MW | Malawi | | |

Verfahren und Vorrichtung zur simultanen Isolierung von genomischer DNS und hochreiner Total RNS

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur schnellen simultanen Isolierung von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS) und zellulärer Total Ribonukleinsäure (RNS) aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien.

Es ist für eine Vielzahl von biologisch, molekularbiologisch, medizinisch-analytisch sowie biochemisch arbeitenden Laboratorien von großer Bedeutung. Damit sind Anwendungsgebiete der Erfindung die Molekularbiologie, Biochemie, Gentechnik, Medizin, Veterinärmedizin und alle angrenzenden Gebiete.

Die simultane Isolierung von genomischer DNS wie auch zellulärer Total RNS aus ein und demselben biologischen Ausgangsmaterial ist bis zum heutigem Zeitpunkt an nur einige wenige praktikierbare Methoden gebunden. So beschreiben Raha, S., Merante, F., Proteau, G. und Reed, J.K. (GATA, 1990, 7(7): 173-177) eine Methode zur Trennung genomischer DNS und zellulärer Total RNS über selektive Präzipitationsschritte unter Verwendung von Lithiumchlorid. Eine weitere Möglichkeit der simultanen Isolierung von DNS und RNS basiert auf Durchführung einer Ultrazentrifugation durch einen Cäsiumchloridgradienten zur Pelletierung der RNS und anschließender Dialyse der DNS aus der Guanidinium-Phase (Coombs, L.M., Pigott, D., Proctor, A., Eydman, M., Denner, J. und Knowles, M.A.; Anal. Biochem. (1990); 188; 338-343). Ein solches Verfahren benötigt einen erheblichen zeitlichen (mindestens 48 Stunden) sowie apparativen Aufwand (Ultrazentrifugationsentechnik, spezielle Spezialrotoren).

Ein zur Zeit relativ häufig genutztes und auch kommerziell verfügbares Verfahren beruht auf der Verwendung eines Reagenz aus Guanidinthiocyanat und Phenol. Das biologische Material wird in diesem Reagenz homogenisiert, wobei sich die RNS nach Zugabe von Chloroform und durchzuführender Phasentrennung in

der wäßrigen Phase befindet und aus dieser präzipitiert wird. Die zurückbleibende Interphase bzw. phenolische Phase enthält sowohl Proteine als auch genomische DNS. Durch Veränderung des pH Wertes und erneuter Phasentrennung soll die genomische DNS ebenfalls in die wäßrige Phase überführt werden und wird aus dieser wiederum präzipitiert. /Chomczynski, P., Biotechniques 1993, 15(3): 532-536/

Prinzipiell muß nach dem Stand der Technik davon ausgegangen werden, daß die isolierte zelluläre Total RNS mit genomischer DNS kontaminiert ist.

So enthält die mittels der von Chomczynski entwickelten und genutzten Reagenz erhaltene wäßrige Phase neben der RNS auch genomische DNS, welche dann ebenfalls aus dieser Phase präzipitiert wird und sich damit in der finalen RNS-Präparation als kontaminierender Bestandteil befindet. Gerade die Kontamination isolierter zellulärer RNS mit genomischer DNS stellt für eine Vielzahl von weiteren Verwendungen der RNS ein gravierendes Problem dar.

So ist z.B die Anwendung eines RNase Protection Assays zwingend an eine DNS freie RNS gebunden. Ferner muß auch für eine Vielzahl von RT-PCR-Reaktionen die verwendete RNS frei von einer Kontamination mit genomischer RNS sein. So besteht z.B. bei Expressionsuntersuchungen von cDNS-Konstrukten in transgenen Organismen als auch bei Nachweisen der Expression intronloser Gene wie auch von noch unbekannten Gensequenzen keine Möglichkeit nachzuweisen, ob das resultierende PCR-Fragment aus der kontaminierenden DNS oder aus der RNS amplifiziert wurde. Sowohl aus der genomischen DNS wie auch aus einer RNS abgeleitete Amplifikate hätten dieselbe Länge. Darüber hinaus sind auch eine Reihe weiterer molekularbiologischer Verfahren, wie z.B. DDRT-PCR oder zellfreie Proteinbiosynthesen in Form gekoppelter in-vitro Transkriptions/Translationssysteme, auf eine DNS freie RNS-Präparation angewiesen.

Dies zeigt die Bedeutung der Isolierung von genomischer DNS-freier Total RNS.

Ein weiteres Problem besteht in der Präparationsdauer zur simultanen Isolierung von genomischer DNS und zellulärer Total RNS sowie in deren arbeitstechnischem Aufwand.

Das einzige zur Zeit kommerziell verfügbare Isolierungssystem benötigt für die Realisierung der simultanen Isolierung beider Nukleinsäurefraktionen mindestens 3 Stunden und ist mit einem nicht unerheblichen Aufwand an notwendigen Reaktionsgefäßen und Feinchemikalien belastet. Weiterhin benötigen alle diese Methoden auch eine relativ große Menge an biologischen Ausgangsmaterialien, so daß bei Vorhandensein von nur limitierter Mengen an Untersuchungsmaterialien meistens eine simultane Isolierung beider Nukleinsäuren nicht mehr möglich ist.

Die Erfindung hat deshalb das Ziel, eine simultane Isolierung von genomischer DNS und zellulärer Total RNS hoher Reinheit und ohne eine Kontamination mit genomischer DNS auch aus sehr kleinen Mengen unterschiedlicher Ausgangsmaterialien zu erreichen. Dabei soll das Verfahren sehr einfach handhabbar sein, nur geringe apparative Ausrüstung benötigen und gestatten, beide Nukleinsäurefraktionen sehr schnell zu isolieren.

Aufgabe der Erfindung war es außerdem, eine Vorrichtung für die gleichzeitige multiple Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen (biologischen und anderen) Ausgangsmaterialien basierend auf der Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Trägerpartikel, bereitzustellen. Die Vorrichtung soll insbesondere für die Isolierung und Reinigung im batch-Verfahren geeignet sein.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Das Verfahren zur simultanen Isolierung von genomischer DNS und zellulärer Total RNS ist dadurch gekennzeichnet, daß die

Nukleinsäuren enthaltenden Materialien lysiert, und das Lysat mit einem mineralischen Träger oder anderen DNS-bindenden Materialien inkubiert wird. Anschließend erfolgt a) die Abtrennung des Trägers vom Lysat durch Zentrifugation, Zugabe von Phenol, Chloroform und Natriumacetat zum Lysat und Präzipitation der Total RNS nach Phasentrennung aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von Isopropanol und b) Waschen des Trägers mit einem Waschpuffer und Ablösung der trägerfixierten genomischen DNS vom Trägermaterial mit einem Puffer geringer Salzkonzentration.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Total RNS ist undegradiert und von exzellenter Qualität ($OD_{260}:OD_{280} = 1.8-2.0$). Von entscheidender Bedeutung ist dabei, daß keine Kontamination genomischer DNS mehr vorliegt. Dies bedeutet einen erheblichen Vorteil gegenüber den meisten bisher Verwendung findenden Präparationsmethoden. Auch die ebenfalls aus ein und derselben biologischen Probe isolierte genomische DNS ist von exzellenter Qualität und für eine Vielzahl weiterer Verfahren als Substrat verwendbar. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich weiterhin durch seine Einfachheit aus, benötigt nur geringe Mengen an Feinchemikalien wie auch Zentrifugengefäße und minimiert auch die Menge und notwendige Zeitdauer des Umganges mit toxischen organischen Solventien (benötigt nur einen Phenol/Chloroform Extraktionsschritt). Das Verfahren gestattet es sowohl genomische DNS als auch zelluläre Total RNS innerhalb von weniger als 1,5 Stunden zu isolieren. Dies bedeutet eine drastische Reduzierung der Präparationsdauer im Vergleich zu allen z.Z. bekannten diesbezüglichen Verfahren. Die Bindung der Desoxyribonukleinsäure erfolgt an der Oberfläche von hochdispersen und nichtporösen Feststoffpartikeln, vorzugsweise an hochdisperse, nichtporöse SiO_2 -Partikeln mit einer Korngröße von 7 bis 300 nm und einer spezifischen Oberfläche von 10 bis 300 m^2/g , besonders bevorzugt mit einem Partikeldurchmesser von 40 nm bei einer aktiven Oberfläche von ca. 50 m^2/g . Die Bindung der

Desoxyribonukleinsäure an das verwendete Trägermaterial wird durch chaotrope Salze des Lysepuffers vermittelt. Die Lyse der Ausgangsmaterialien und die Bindung an das Trägermaterial erfolgen im selben Reaktionsgefäß.

Gegebenenfalls werden zur Lyse des die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien chaotrope Salze wie zum Beispiel Guanidinthiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Litiumchlorid oder Litiumchlorid/Harnstoff-Gemische mit Ionenstärken >4M eingesetzt.

Vorzugsweise wird der Träger mit der fixierten genomische DNS vom Lysat durch einen kurzen Zentrifugationsschritt abgetrennt.

Die am Träger gebundene genomische DNS wird besonders bevorzugt mit einem Waschpuffer, vorzugsweise bestehend aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie 70%v/v Ethanol, gewaschen und mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) bei einer Temperatur von 48-56°C, vorzugsweise 52°C, eluiert.

Das Verfahren wird als batch- Verfahren oder als chromatographisches Verfahren durchgeführt.

Das sehr einfache und nur wenige experimentelle Schritte umfassende Verfahren ist in idealer Weise für eine breite Anwendung in medizinischen Diagnostik-Laboratorien geeignet und steht in diesem Zusammenhang auch Anwendern zur Verfügung, welche nicht über spezielle molekularbiologisch-biochemische Kenntnisse verfügen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist unter anderem die Voraussetzung gegeben, aus limitierten Mengen an Untersuchungsmaterialien sowohl die DNS als auch die RNS zu isolieren. So ist es möglich, genomische DNS und zelluläre Total RNS sogar aus sehr kleinen Mengen ($< 10^5$ Zellen; < 1 mg

Gewebematerial) zu isolieren. Dies erlaubt Untersuchungen von Genen (DNS-Untersuchung) und deren Expression (RNS-Untersuchung). Vor allem quantitative Abnormitäten von Genen und deren RNS-Expression scheinen eine wesentliche Bedeutung von Vorgängen während der Kanzerogenese und Metastasierung wie auch bei der postoperativen Progression von Tumorpatienten zu spielen. Die Möglichkeit des Findens korrelativer Zusammenhänge bezüglich der Anzahl bestimmter tumorassoziierter DNS-Sequenzen, deren Struktur (Sequenz-information) und deren Expression (RNS) ist somit von entscheidender Bedeutung für ein besseres Verstehen von Zusammenhängen pathogener Mechanismen. Ferner erlaubt eine Methode der simultanen Isolierung von DNS und Total RNS auch die Untersuchung unterschiedlicher Spleißing-Mechanismen (z.B. Alternatives Spleißen, Trans-Spleißen). Die Untersuchung von Spleißvorgängen hat sowohl im Bereich der Grundlagenforschung (Untersuchung von Vorgängen der Genregulation) wie auch auf medizinischen Gebiet (Aufklärung immunologischer Phänomene bei parasitären Erkrankungen; z.B. nach Infektion mit Afrikanischen Trypanosomen) ebenfalls eine große Bedeutung. Die Mehrzahl solcher Studien scheitert am Fehlen eines geeigneten methodischen Instrumentariums zur simultanen Isolierung von DNS und RNS, vor allem bei Vorhandensein nur geringer Mengen an Untersuchungsmaterialien.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren besteht die Möglichkeit der simultanen Isolierung von genomischer DNS und zellulärer Total RNS aus bakteriellen Lysaten, aus Zellkulturen, intakten oder gefrorenen Gewebeproben, Spermien, Körperflüssigkeiten, Pflanzenzellen, Hefezellen sowie Blutserum, Blutplasma und Vollblut.

Die erfindungsgemäßen Verfahrensvarianten erlauben die simultane Isolierung beider Nukleinsäuren (DNS und RNS) mit einem extrem geringen zeitlichen sowie apparativen Aufwand. Es ist keine zeitaufwendige Proteinase-Verdauung notwendig. Der geringe zeitliche Aufwand der simultanen Isolierung von DNS und

RNS aus ein und demselben Ausgangsmaterial stellt für eine Vielzahl von potentiellen Anwendern eine enorm wichtige Größe dar und bedeutet damit einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Verfahren. Die Eigenschaft des verwendeten Lysepuffers, sowohl die zelluläre Integrität zu zerstören wie auch endogene und exogene DNAsen und vor allem RNAsen hochpotent zu inaktivieren, gestattet es darüber hinaus, DNS und RNS aus Frischpräparaten unter Feldbedingungen (z.B. bei Expeditionen, nach Operationen) zu isolieren, ohne zusätzliche Kühlbedingungen unter Lysepuffer zu lagern und zu transportieren und die Ribonukleinsäuren ohne Verlust ihrer biologischen Aktivität einer weiteren Verwendung zuzuführen.

Das erfinderische Vorrichtung erfüllt in idealer Weise die Anforderungen von Nukleinsäure-Reinigungssystemen auf der Basis der Verwendung mineralischer Trägermaterialien.

Die Vorrichtung besteht aus folgenden Hauptgruppen:

- quaderförmiges Kunststoffgehäuse mit abgeschrägter Bedieneinheit (enthält Gleichstrommotor mit Drehzahlregelung als Antrieb für die Schütteleinrichtung, Zeitschaltuhr zur Einstellung der Schüttelzeit, Lagerblock zur Aufnahme der Antriebswelle)
- Schütteleinrichtung mit Spezialbohrungen für Reaktionsgefäße
- Schutzvorrichtung für Motor und Schütteleinrichtung

Das mechanische Wirkprinzip stellt sich wie folgt dar:

Die Antriebswelle wird durch einen Gleichstrommotor angetrieben. An einem Wellenende der Antriebswelle ist ein Exzender mit einem schrägstehenden Zapfen angebracht,

welcher die Hauptbewegung auf die Schüttelplattform überträgt. Elastische Glieder die sich zwischen dem Lagerblock und der Schüttelplattform befinden, verhindern das Mitdrehen der Schüttelplattform.

Die besondere Gestaltung der Aufnahmebohrungen für die Reaktionsgefäße mit den zu untersuchenden Proben ermöglicht, daß sich diese während des Schüttelvorganges sowohl um die eigene Achse drehen als auch unregelmäßig in senkrechter Richtung nach oben bewegen. Ein speziell angeordneter schwenkbarer Schutzring mit elektrischer Schaltvorrichtung dient dem mechanischen Abfedern der Reaktionsgefäße und verstärkt dabei die gewünschte Bewegung. Darüber hinaus verhindert der Schwenkring ein Herausschleudern der Reaktionsgefäße.

Der Einsatz der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Reinigung bzw. Isolierung von Nukleinsäuren ist dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien in ein 1.5 bzw. 2.0 ml Reaktionsgefäß verbracht und mit einem Lysepuffer versetzt werden.

Anschließend werden mindestens 12 Reaktionsgefäße in dafür vorgesehene Bohrungen der Schüttelplattform gesetzt und unter der erzeugten überlagernden Schüttelbewegung inkubiert. Diese Bewegung erlaubt die schonende Lyse des Ausgangsmaterials ohne Scheren hochmolekularer Nukleinsäurefraktionen.

Das Lysat wird dann mit einem mineralischen Trägermaterial z.B. einem nichtporösen und unstrukturierten, hochdispersen sowie homogenen chemisch reinen SiO_2 -Träger inkubiert. Die an das dieses Trägermaterial gebundene DNS wird anschließend pelletiert und der nun nur noch RNS enthaltende Überstand in ein neues Zentrifugengefäß überführt, mit Phenol und Chloroform sowie einer Natriumacetatlösung versetzt und nach erfolgter Phasentrennung die zelluläre Total RNS aus der

wäßrigen Phase durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert. Die am Trägermaterial fixierte genomische DNS wird während der Dauer der RNS-Präzipitation mit einem Waschpuffer versetzt und gewaschen. Dies erfolgt durch Inkubation der Reaktionsgefäße. Die spezifische sich überlagernde Bewegung der Vorrichtung erlaubt eine extrem schnelle Resuspendierung des Trägermaterials und somit ein hocheffizientes und schnelles Waschen und damit die Entfernung von Kontaminanten von den gebunden Nukleinsäuren. Das Waschen der Proben erfolgt wiederum gleichzeitig für mindestens 12 Proben. Nach Entfernung des Waschpuffers werden die gebundenen Nukleinsäuren mit einem Puffer geringer Salzkonzentration vom Träger abgelöst, in dem die Reaktionsgefäße in der Vorrichtung zur Resuspendierung des Trägermaterials plaziert worden, wobei das Elutionsmittel eine Temperatur von 48-56 °C aufweist.

Der Einsatz der Vorrichtung ermöglicht zum erstenmal die gleichzeitige Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Vielzahl von Proben aus einem breiten Spektrum an unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien mittels der angewendeten Methode der Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Trägermaterialien.

Die Vorrichtung mit seiner spezifischen Bewegungsform löst erstmalig das für diese DNA-Isolierungsmethoden bekannte Problem der Resuspendierung des Träger-Nukleinsäurepellets in hervorragender Weise.

Darüber hinaus ist es auch in idealer Weise geeignet die Effizienz der Lyse des Ausgangsmaterials zu erhöhen.

Es stellt somit eine halbautomatische Systemlösung für alle Nukleinsäure-Reinigungssysteme dar, welche als 'batch-Verfahren' angewendet die Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Materialien nutzen.

Damit ist es möglich, Nukleinsäuren aus

a) großen Probemengen standardisiert, reproduzierbar und extrem schnell

b) extrem geringen Mengen an Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien

b) sehr 'schwierigen' und stark mit organischen und anorganischen Verunreinigungen kontaminierten unterschiedlichen biologischen und anderen Ausgangsmaterialien wie z.B. Stuhlproben, Knochen u.a. in einer Qualität und Quantität zu isolieren, welche nachfolgende enzymatische Manipulationen mit den isolierten Nukleinsäuren möglich werden läßt.

Mittels der Vorrichtung wird die Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren über die Bindung an mineralische Trägermaterialien in 'batch-Verfahren' auf eine qualitativ neue Stufe gestellt.

So besteht erstmals die Möglichkeit die großen diagnostischen Vorteile von 'batch-Systemen' zur Reinigung von Nukleinsäuresystemen auf der Basis der Bindung an mineralische Trägerpartikel (Reduzierung der Kontaminationsgefahr, hohe Sensitivität) durch die standardisierte gleichzeitige Isolierung einer Vielzahl von Proben in praxi nutzbar zu machen.

Die Erfindung soll nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Simultane Isolierung genomischer DNS und zellulärer Total RNS aus einer eukaryontischen Monolayer-Zellkultur (25 cm² Flasche ; ca 5x10⁶ Zellen)

Ernten der Zellen mit einem Scraper und Überführen der geernteten Zellen in 1.5 oder 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Lyse der Zellen durch Zugabe von Lysepuffer (Guanidinthiocyanat; N-Lauryl-Sarcosyl; DTT; Natriumcitrat:) und Plazieren von bis zu 12 Reaktionsgefäße in die Vorrichtung. Zugabe des Trägermaterials zur Zell-Lyse-Suspension, kurzes Vortexen, Inkubation für 5 Minuten in einem Eisbad und anschließende Pelletierung des Trägermaterials durch kurze Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (30 Sekunden).

Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Zentrifugengefäß und Zugabe von Phenol (wassergesättigt oder Tris-gepuffert), Chloroform und Natriumacetat und 5 minütige Inkubation auf Eis. Nach erfolgter Phasentrennung durch Zentrifugation wird die obere wäßrige Phase in ein neues Eppendorf-Zentrifugengefäß überführt, mit einem gleichem Volumen Isopropanol versetzt und zur Präzipitation der RNS für 20-30 Minuten bei -20°C inkubiert. Die am Trägerpellet gebundene genomische DNS wird während der Isopropanolfällung der RNS mit Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA; 70% v/v Ethanol) versetzt und gewaschen. Das Waschen der trägerfixierten genomischen DNS erfolgt dabei mittels der Vorrichtung, welche die Resuspendierung des Trägermaterials realisiert. Anschließend wird die genomischen DNS durch Zugabe eines Elutionspuffers (Tris; EDTA) bei 52°C vom Trägermaterial abgelöst, der Träger durch kurze Zentrifugation von der eluierten genomischen DNS abgetrennt und diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das nach Inkubation bei -20°C und anschließender Zentrifugation erhaltene RNS-Pellet wird zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach erfolgter vollständiger Entfernung des Ethanols das

Pellet in RNase freiem TE Puffer oder DEPC-behandeltem Aqua Bidest (Diethylpyrocarbonat) aufgenommen.

Beispiel 2

Abb. 1 - Gesamtansicht der Vorrichtung

Bezugszeichen

- 1 - quaderförmiges Kunststoffgehäuse
- 2 - abgeschrägte Bedieneinheit
- 3 - Gleichstrommotor
- 4 - Drehzahlregelung
- 5 - Zeitschaltuhr
- 6 - Lagerblock
- 7 - Antriebswelle
- 8 - Schütteleinrichtung
- 9 - Schutzvorrichtung
- 10 - Probegefäß
- 11 - Schüttelplattform
- 12 - Spezialbohrung
- 13 - schwenkbarer Schutzring
- 14 - elektrische Schaltvorrichtung
- 15 - Excender
- 16 - Zapfen
- 17 - elastische Glieder

Patentansprüche

1. Verfahren zur simultanen Isolierung von genomischer DNS und zellulärer Total RNS, gekennzeichnet durch Lyse von diese Nukleinsäuren enthaltenden Materialien, Inkubation des Lysates mit einem mineralischen Träger oder anderen DNS-bindenden Materialien, sowie
 - a) Abtrennung des Trägers vom Lysat durch Zentrifugation, Zugabe von Phenol, Chloroform und Natriumacetat zum Lysat und Präzipitation der Total RNS nach Phasentrennung aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von Isopropanol und
 - b) Waschen des Trägers mit einem Waschpuffer und Ablösung der trägerfixierten genomischen DNS vom Trägermaterial mit einem Puffer geringer Salzkonzentration.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Lyse des Ausgangsmaterials chaotrope Salze, vorzugsweise Guanidinthiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Litiumchlorid oder Litiumchlorid/Harnstoff-Gemische mit Ionenstärken $>4M$ eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß als Trägermaterialien zur Bindung der genomischen DNS hochdisperse, nichtporöse SiO_2 -Partikeln mit einer Korngröße von 7-300 nm, vorzugsweise 40 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von 10-300 m^2/g , vorzugsweise 50 m^2/g , eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 -3, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger mit fixierter genomischer DNS vom Lysat durch einen kurzen Zentrifugationsschritt abgetrennt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß am Träger gebundene genomische DNS mit einem Waschpuffer,

vorzugsweise bestehend aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie 70%v/v Ethanol, gewaschen wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß trägerfixierte genomische DNS mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) bei einer Temperatur von 48-56°C, vorzugsweise 52°C, eluiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß es als batch- Verfahren durchgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß es als chromatographisches Verfahren durchgeführt wird.

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur gleichzeitigen multiplen Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus biologischen und anderen Ausgangsmaterialien basierend auf der Bindung der Nukleinsäuren an mineralische Trägerpartikel gekennzeichnet durch

- ein quaderförmiges Kunststoffgehäuse (1) mit abgeschrägter Bedieneinheit (2), die einen Gleichstrommotor (3) mit Drehzahlregelung (4), eine Zeitschaltuhr (5) und einen Lagerblock (6) mit Antriebswelle (7) umfaßt,

- eine Schütteleinrichtung (8) mit Probegefäßen (10) und

- eine Schutzvorrichtung (9) für Motor und Schüttel-einrichtung.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schütteleinrichtung (8) aus

- einer Schüttelplattform (11) mit Spezialbohrungen (12) für mindestens 12 Probegefäße und

- einem schwenkbaren Schutzring (13) mit elektrischer Schaltvorrichtung (14) besteht.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß sich an einem Wellenende der Antriebswelle, ein Excender (15) mit einem schrägstehenden Zapfen (16) befindet.

1/1

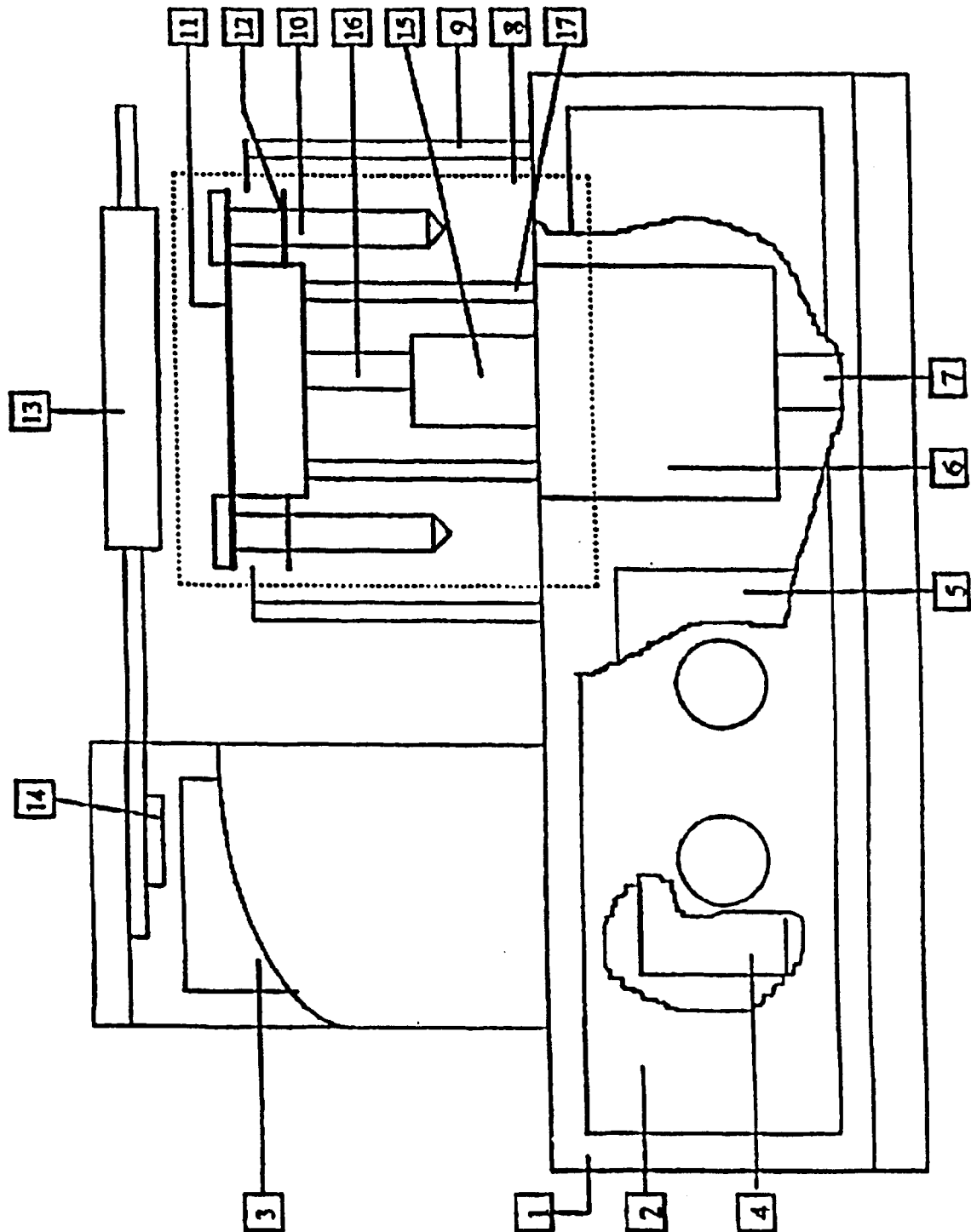


Abb. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07H1/08 C12Q1/68 B01F11/00 B01F13/04
//C12N15/10,C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y | WO 95 34569 A (INVITEK GMBH ET AL) 21 December 1995 see the whole document --- | 1-8 |
| Y | WO 95 28409 A (UNIV ROCKEFELLER) 26 October 1995 see page 23 - page 24 --- | 1-8 |
| A | DE 44 22 044 A (INVITEK GMBH) 21 December 1995 see the whole document --- | 1-8 |
| P,A | DE 44 47 015 A (INVITEK GMBH) 4 July 1996 see the whole document ----- | 1-8 |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1996

Date of mailing of the international search report

17. 01. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

CEDER O.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ DE 96/ 01291

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- Claims 1-8: process for the simultaneous isolation of genomic DNA and very pure total RNA.
- Claims 9-11: device for agitating sample vessels.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-8

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

ational Application No

PCT/DE 96/01291

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|---|----------------------------------|
| WO-A-9534569 | 21-12-95 | DE-A- 4422040 DE-A- 4422044 DE-A- 4447015 | 21-12-95 21-12-95 04-07-96 |
| WO-A-9528409 | 26-10-95 | NONE | |
| DE-A-4422044 | 21-12-95 | WO-A- 9534569 | 21-12-95 |
| DE-A-4447015 | 04-07-96 | WO-A- 9534569 | 21-12-95 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 96/01291

| | | |
|---|--|---|
| A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C07H1/08 C12Q1/68 B01F11/00 B01F13/04 //C12N15/10, C07H21/00 | | |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK | | |
| B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12Q C07H | | |
| Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen | | |
| Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) | | |
| C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| Y | WO 95 34569 A (INVITEK GMBH ET AL) 21.Dezember 1995 siehe das ganze Dokument --- | 1-8 |
| Y | WO 95 28409 A (UNIV ROCKEFELLER) 26.Oktober 1995 siehe Seite 23 - Seite 24 --- | 1-8 |
| A | DE 44 22 044 A (INVITEK GMBH) 21.Dezember 1995 siehe das ganze Dokument --- | 1-8 |
| P,A | DE 44 47 015 A (INVITEK GMBH) 4.Juli 1996 siehe das ganze Dokument ----- | 1-8 |
| <input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie | | |
| * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. November 1996 | | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 17. 01. 97 |
| Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Bevollmächtigter Bediensteter CEDER O. |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01291

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

- Ansprüche 1- 8: Verfahren zur simultanen Isolierung von genomischen DNA und hochreiner Total RNA
- Ansprüche 9-11: Vorrichtung zum Schütteln von Probegefäßen

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-8.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01291

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO-A-9534569 | 21-12-95 | DE-A- 4422040 | 21-12-95 |
| | | DE-A- 4422044 | 21-12-95 |
| | | DE-A- 4447015 | 04-07-96 |
| ----- | | | |
| WO-A-9528409 | 26-10-95 | KEINE | |
| ----- | | | |
| DE-A-4422044 | 21-12-95 | WO-A- 9534569 | 21-12-95 |
| ----- | | | |
| DE-A-4447015 | 04-07-96 | WO-A- 9534569 | 21-12-95 |
| ----- | | | |